

学位論文要旨

学位論文題名

Development of wide-area scanner for high-speed AFM
and applications

(和訳)

高速 AFM 用広域スキャナーの開発とその応用研究

金沢大学大学院自然科学研究科

数物科学専攻

氏名：渡辺 大輝

Abstract

High-speed atomic force microscopy (HS-AFM) has recently been established. The dynamic processes of protein molecules in action have been successfully visualized using HS-AFM. However, its maximum scan ranges in the XY-directions have been limited to $\sim 1\text{ }\mu\text{m}$ and $\sim 4\text{ }\mu\text{m}$, respectively, making it infeasible to observe the dynamics of live cells. Here, we develop a wide-area scanner with a maximum XY scan range of $\sim 45\text{ }\mu\text{m} \times 45\text{ }\mu\text{m}$ by magnifying the displacements of stack piezoelectric actuators using a leverage mechanism. Mechanical vibrations produced by fast displacement of the X-scanner are suppressed by a combination of feed-forward inverse compensation and the use of triangular scan signals with rounded vertices. As a result, the scan speed in the X-direction reaches 6.3 mm/s even for a scan size as large as $\sim 40\text{ }\mu\text{m}$. The nonlinearity of the XY-piezoelectric actuators' displacements that arises from their hysteresis is eliminated by polynomial-approximation-based open-loop control. The interference between the XY-scanners is also eliminated by the same method. The usefulness of this wide-area scanner is demonstrated by video imaging of dynamic processes in live bacterial and eukaryotic cells.

A tip-scan type HS-AFM, which is combined with total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) has recently been developed. Using this system, the topographic and fluorescence images of single protein molecules in action have been simultaneously visualized. However, its maximum scanning range in XY- directions have been limited to $\sim 20\text{ }\mu\text{m}$ and $\sim 3\text{ }\mu\text{m}$, respectively, making it impossible to visualize the dynamics of much larger samples. Here, we improve a laser-tracking system and expand the tracking range in X- and Y- directions to $\sim 50\text{ }\mu\text{m}$ and $\sim 32\text{ }\mu\text{m}$, respectively by increasing an angular variation of a mirror-tilter unit changing the arrangement and the adhesive area

between piezoactuators and base plate of the unit. The Shift of the X-direction of the scanner with large displacement of the Z-scanner is eliminated by modifying a triangular input signal to the mirror-tilter unit. We also developed a wide-area scanner for the tip-scan HS-AFM system. The capability of this system is demonstrated by measuring the laser displacement and large-area imaging of a square grating sample.

和文要旨

現在までに、高速 AFM によって生命現象を司るタンパク質のさまざまな動態変化が明らかになってきた。それは高速 AFM の持つ高い空間分解能と、高い時間分解能がなせる技である。またこれまでに、この高速 AFM をより低侵襲・高速走査・高空間分解能な顕微鏡にするべく、ダイナミック PID 法、アクティブダンピング法や X 方向スキャナーのフィードフォワード制御といった様々な技術が開発されてきた。しかしながら、ほとんどの生命現象は細胞中で起こっていることも事実である。これまで高速 AFM で得られた観察結果はタンパク質一分子の構造変化、あるいは複数分子の相互作用であったが、それは単に生命現象の一部を切り取って観察しているに過ぎない。実際には細胞内外で、あらゆるタンパク質分子が相互的に、また複雑に作用してひとつの生命現象として見えてくる。そして、その動態を直接生細胞上で観察したいという需要は確実に存在する。

そこで本研究では、高速 AFM の観察対象を細胞まで拡大するために、広域な走査範囲をカバーすることだけでなく、広域な範囲をより高速に走査することも目指して新たな高速 AFM 用スキャナーの開発を目標に掲げた。テコの原理をスキャナーに応用することで、結果的に走査範囲を最大で $45\text{ }\mu\text{m} \times 45\text{ }\mu\text{m}$ まで拡大することに成功した[図 1-(a)]。しかし走査範囲を拡大させることによって、既存のスキャナーでは起こることがなかった問題が発生した。高速走査の際に起こる X 方向の振動はフィードフォワード制御やラウンディング法によって走査信号を改変することで抑制可能となった[図 1-(b)]。圧電素子固有のヒステリシス特性の顕在化は予め特性を取得しておき、そのヒステリシスカーブを打ち消すように走査信号を改変することで線形動作を実現した[図 1-(c)]。さらにテコの原理を適用したスキャナーの構造による XY 方向走査時の干渉問題が発生したが、入力信号に干渉変位分の信号を加算し走査することでこの問題を解決した[図 1-(d),(e)]。そのスキャナーを用いてタンパク質分子よりも遥かに巨大な細菌や哺乳類細胞の動態可視化[図 2-(a)]だけでなく、走査信号を出力する D/A ボードの限界分解能を鑑みて、ピエゾドライバーの出力利得を調整することで、より高分解能な像を取得することにも成功した[図 2-(b)]。

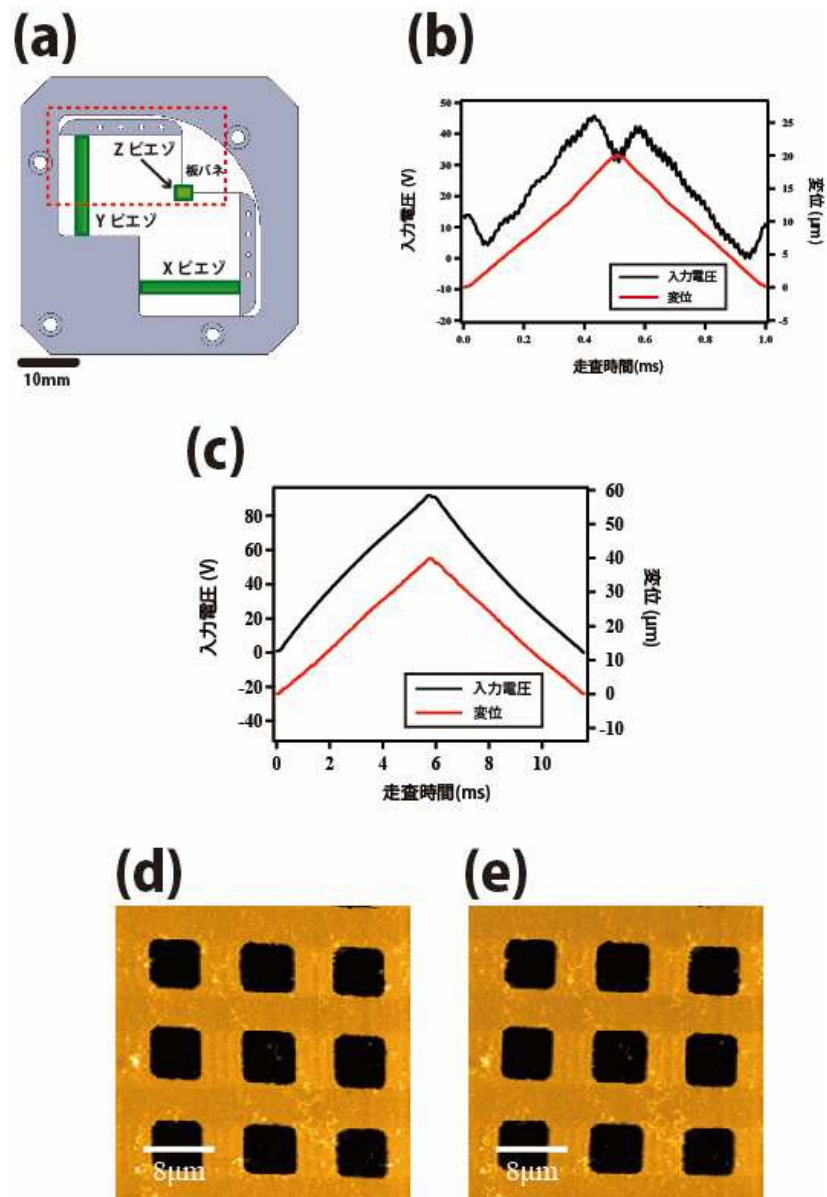
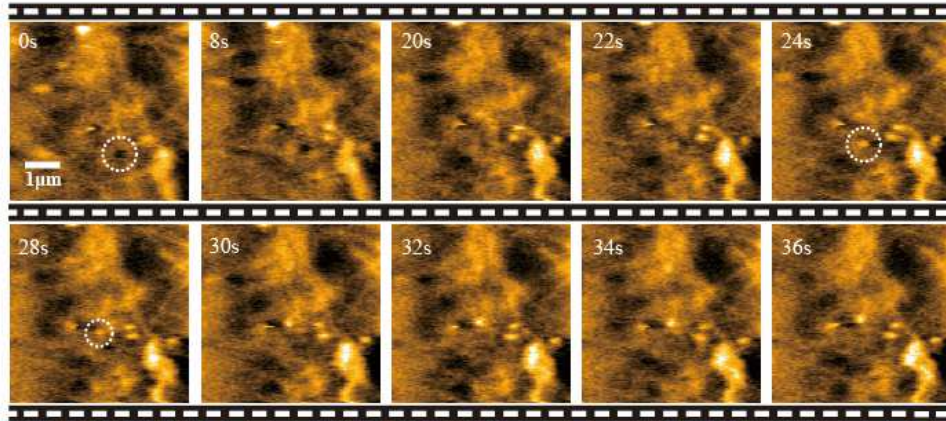


図 1. 新たに開発された広域走査用スキャナー

(a) テコの原理を応用した変位拡大機構を組み込んだスキャナーの模式図。(b) フィードフォワード制御とラウンディング法を入力信号に適用することで X 方向の振動を抑制 (黒線：入力信号、赤線：変位)。(c) 予め変位を測定し、それを打ち消すように走査信号を作成することで線形動作を実現。(d) XY スキャナー間に起こる干渉により、標準試料が歪んでいることを示した AFM 像。(e) 干渉補正後の AFM 像。

(a)



(b)

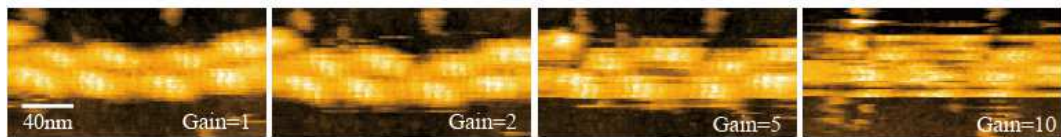


図 2. 広域走査用スキャナーで得られた高速 AFM 像

(a) 本研究で開発された広域スキャナーによる PtK2 細胞上のエキソサイトーシス過程を捉えた連続高速 AFM 像。白破線丸部分は細胞上のピットの位置を示す。(b) 広域スキャナーと新規ピエゾドライバを用いて得られたアクチンフィラメントの高分解能 AFM 像。2 本のアクチンフィラメントが平行に並んでいる。ピエゾドライバのゲインは左から順に 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍。

また、最近蛍光顕微鏡と同時観察が可能なティップスキャン型高速 AFM が開発され、タンパク質一分子の同時観察に成功している。しかしながら現状ではタンパク質一分子スケールでの観察が限界である。この一体型高速 AFM ではカンチレバー自身を走査する、ティップスキャン方式を採用しており、カンチレバー変位検出のためのレーザー光を反射ミラーの傾きを変えることで走査し、カンチレバーの XY 方向の動きをトラッキングしている。このミラーの構造を最適化して、XY 方向の最大トラッキング範囲を従来の $20\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ から $53\ \mu\text{m} \times 32\ \mu\text{m}$ まで拡大させることに成功した。さらに通常の高速 AFM 用広域スキャナーの技術をこの一体型高速 AFM にも適用することで、広域走査範囲のイメージングに

成功した。さらに Z 方向のスキナーを大きく変位させた場合、X 方向にも変位してしまう問題が発生した。これはティップスキャン型高速 AFM 本体の設計が原因となっているのだが、ミラーチルターユニットに位相とオフセットを改変した走査信号を入力することでこの X 方向の変位を抑制することに成功した。

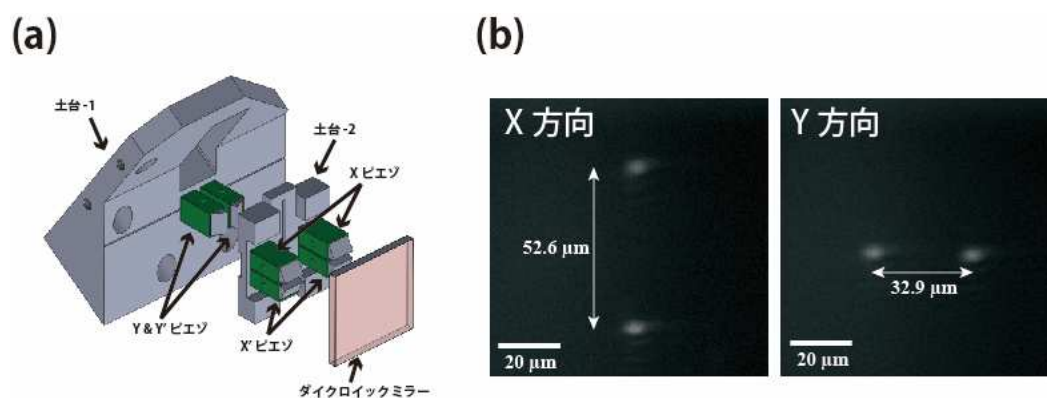


図 3. ティップスキャン型高速 AFM 用広域ミラーチルターユニット

(a) 本研究で開発された広域走査用ミラーチルターユニットの概略図。(b) 広域ミラーチルターユニットの最大走査範囲を示した光学顕微鏡像。

本研究で新しく開発され広域走査可能な高速 AFM スキャナーや、ティップスキャン型高速 AFM で適用された走査範囲拡大技術はより複雑な系である細胞上で起こる生体分子のダイナミクスの可視化に有効な技術であり、今後広く活用されることが期待される。

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

高速 AFM 用広域スキャナーの開発とその応用研究

2. 論文提出者 (1) 所 属 数物科学 専攻

(2) 氏 名 ふりがな 渡辺 大輝 わたなべ ひろき

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

高速 AFM は蛋白質分子の機能動態を高解像で可視化できる唯一の顕微鏡である。一方、分子よりも遥かに大きな生細胞などで起こる動的な現象及びそれらの高次構造体上での分子動態の可視化も強く望まれている。大きな試料系を観察するにはスキャナーの走査範囲の大幅な拡大が必要になるが、スキャナーの共振周波数が下がるため高速走査が困難になる。渡辺君はこの困難な課題に取り組んだ。逆伝達補償法より振動抑制に成功し、圧電素子のヒステリシスと XY 走査間の干渉の問題については、フィードフォワード補償法により解決した。結果、X スキャナーの共振周波数の半分の周波数でも三角波走査することが可能になり、生細胞で起こる動態観察が実現された。ところで、従来の高速 AFM では、装置構成を比較的単純化できる試料ステージ走査方式を採用している。だが、試料ステージは小型軽量のものに限られるという制約に加え、様々な光学技術との融合が困難という問題を抱えている。この問題を克服するために、探針走査方式の高速 AFM が所属研究室ですでに開発されているが、ここでも走査範囲の拡大に伴う問題が顕在化していた。渡辺君はこの問題解決にも取り組み、いくつかの技術開発を通して広域・高速走査可能な探針走査型の高速 AFM を実現することに成功した。この高速 AFM は従来よりも幅広い応用が可能なため、大きな前進となった。困難な課題に取り組む、困難を解決する手法を考案、実現したこの成果は博士（理学）の学位に値するものと判断した。

4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) (合格) ・ 不合格
(2) 授与学位 博 士 (理学)